Anwendung der Engelmann'schen Bacterienmethode auf die Untersuchung thierischer Gewebe

Alfred Exner,

stud. med.

Aus dem physiologischen Institut der Wiener Universität.

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. Jänner 1897.)

Engelmann[1] hat im Jahre 1881 eine Methode angegeben, die es erlaubt, unter gewissen Verhältnissen noch sehr kleine Mengen von Sauerstoff nachzuweisen. Als Reagens benützte er Fäulnissbacterien. Die Sauerstoffausscheidung von lebenden grünen Algenzellen zeigte er folgendermaassen. Er gab auf einen Objectträger einen Tropfen bacterienhältigen Wassers, fügte einige Algenzellen hinzu und bedeckte das Präparat mit einem Deckglas. Nach kurzer Zeit sammelten sich Schaaren von in lebhafter Bewegung befindlichen Bacterien um die grüne Zelle. Durch eine Reihe von Modificationen dieses einfachsten Versuches wies Engelmann nach, dass die Ansammlung der Bacterien um die grüne Zelle wirklich auf dem Sauerstoffbedürfnisse der ersteren beruhe. Man sieht nämlich bei diesem Versuche an den Rändern des Deckglases, wo die Luft mit der Flüssigkeit in Berührung kommt, eine ziemlich scharf abgegrenzte Zone von dicht gedrängten Bacterien in lebhafter Bewegung, dann folgt eine Zone, wo nur wenige Bacterien zu sehen sind, die meisten verhalten sich ruhig und nur manchmal schiesst ein Individuum aus der bewegten Randzone unter die ruhenden Bacterien. Um die Algenzellen selbst sind wieder

---

[1] Pflüger's Archiv f. Physiologie, Bd. XXV, S. 285.

Bacterienmassen in lebhaftester Bewegung, ziemlich scharf getrennt von der ruhenden Zone, zu sehen.

Wenn Engelmann zu einem bacterienhältigen, zwischen zwei Gläsern eingeschlossenen, Wassertropfen, nachdem alle anfangs schwärmenden Bacterien zur Ruhe gekommen waren, einen Tropfen defibrinirten arteriellen Blutes hinzuliess, so begann an der Grenze beider Flüssigkeiten die Bewegung der Bacterien von Neuem. Wenn er Blut nahm, durch das unmittelbar vorher ein Strom von Kohlenoxyd geleitet worden war, geschah dies nicht oder nur an ganz vereinzelten Stellen und nur auf sehr kurze Zeit.

Später fand Pfeffer,[1] dass Bacterien chemisch erregt werden können durch ein Stückchen Fleisch, ein abgeschnittenes Fliegenbein oder durch andere Substanzen, zu denen sie dann eilen und sie in lebhafter Bewegung umschwärmen. Wurde zu einem Tropfen von Bacterienwasser eine mit einprocentiger Fleischextractlösung gefüllte Capillare gebracht, so konnte ein reichliches Einschwärmen der Bacterien in die Capillare beobachtet werden. Bei Ersatz der Fleischextractlösung durch andere Substanzen und jedesmaliger reichlicher Versorgung mit Sauerstoff war das Verhalten der Bacterien ein wechselndes.

Es geht daraus hervor, dass die Lebhaftigkeit der Bewegung und die Dichte der Bacterienansammlung erstens abhängig ist von der Quantität des für die Respiration verfügbaren Sauerstoffes, zweitens, im Falle dieser reichlich vorhanden ist, auch von der Natur der als Nahrungsmittel aufzufassenden gebotenen Substanz.

Ich habe nun nach der Engelmann'schen Methode thierische Gewebe untersucht. Verwendet wurden dazu zwei Arten von Bacterien. Ich liess Wasser, dem ich etwas Fleisch zugesetzt hatte, einige Tage bei offenen Fenstern stehen, bis sich reichlich Bacterien an der Oberfläche des Wassers angesammelt hatten; dann wurde ein Tropfen abgehoben, in Bouillon gebracht, auf Gelatineplatten Reinculturen angelegt, die

---

[1] Pfeffer, Locomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. Unters. aus d. Botan. Inst. zu Tübingen. Bd. I, S. 363.

passende Art experimentell ermittelt und auf Nähragar weiter cultivirt. Zu den Versuchen wurden nur Reinculturen benützt. Herr Dr. A. Lode, Assistent am hygienischen Institut zu Wien, war so freundlich, mir die beiden Bacterienarten zu bestimmen, wofür ich ihm meinen wärmsten Dank ausspreche. Ich lasse die Beschreibung, die er mir gibt, folgen. »Die erste Art ist ein Bacterium von der Form eines plumpen Stäbchens 2 μ lang, mit lebhafter Eigenbewegung; an einem Pol besitzt es Geisselfäden in der Anzahl von 1 bis 8, die an Länge dasselbe ungefähr um das Vierfache übertreffen. Sporenbildung wurde nicht beobachtet. Die Culturen verflüssigen Gelatine und zeigen prächtige Fluorescenz. Im tiefen Gelatinestich zeigen sie üppiges Wachsthum auf der Oberfläche, Fluorescenz und Auftreten von Gasblasen. Die Culturen wachsen am besten bei 18—20° C; auf Agar sind sie braungelb gefärbt, riechen ebenso wie die Gelatineculturen deutlich nach Fruchtäther und zeigen alkalische Reaction. Auf Kartoffeln wachsen die Culturen in Form eines bräunlichgelben Rasens; die Umgebung des Impfstriches ist bräunlich verfärbt.

In flüssigen Nährmedien bildet das Bacterium eine Kahmhaut, es kann jedoch auch anaërob gedeihen. Nach der gegebenen Beschreibung gehört es sicherlich in die Gruppe der fluorescirenden Bacillen, und zwar stimmt es am meisten mit dem in Wasser und Faulflüssigkeiten überaus verbreiteten Bacillus fluorescens liquefaciens überein.[1]

Die zweite Art ist eine mit Bacillus aquatilis communis verwandte Form, die ähnlich, wie dies Zimmermann bei einer Varietät des B. aquatilis communis,[2] bei B. aquatilis radiatus (Zimmermann) beobachtet hat, facultativ anaërob ist und Gas zu bilden vermag. Die einzelnen Individuen sind von der Grösse der Typhusbacterien mit lebhafter Eigenbewegung; sie besitzen zwei bis drei endständige Geisseln. Die Mikrobien wachsen am besten bei Zimmertemperatur und besitzen

---

[1] Kruse, Systematik der Bacterien Flügge's Mikroorganismen. 1896. II, S. 292.

[2] Kruse, Systematik der Bacterien Flügge's Mikroorganismen. 1896. II, S. 315.

Gährungsvermögen. Die Agar- und Gelatineculturen riechen nach Ammoniak. Sie verflüssigen die Gelatine unter sehr starker Trübung derselben. Am Rande der Colonie bemerkt man radiär gestellte Ausstrahlungen; im Inneren ist lebhafte Bewegung. Bouillon wird gleichmässig getrübt. Das Bacterium wächst auf Kartoffeln in Form eines schmierigen, gelblichbraunen Rasens.«

Beide von mir gewählten Bacterienarten zeigen die Engelmann'sche Reaction auf grüne Algenzellen. Nahm ich statt der Algen etwas Muskelgewebe, so sammelten sich auch um dieses Schaaren von Bacterien in lebhafter Bewegung. Eine ähnliche Ansammlung konnte ich beobachten, wenn ich andere Gewebe des thierischen Körpers verwendete. Eine deutliche Reaction geben: Blut, Skeletmuskel, Herzmuskel, Fett, Leber, Thyroidea, Ovarium vom Frosch, Milz, Knorpel, Gehirn, Rückenmark, Nerv, ebenso marklose Nervenfasern aus dem Tractus olfactorius des Hechtes und Retina.

Keine Reaction geben: Knochen, Lunge, Haut vom Frosch, Magenschleimhaut, Niere, Submaxillaris von der Katze, Pankreas und Ovarium vom Kaninchen.

Alle genannten Gewebe habe ich dem frisch getödteten Frosch, wenn nicht im Folgenden ausdrücklich ein anderes Thier genannt ist, entnommen und in 0·7 procentiger Kochsalzlösung, in der Bacterien aufgeschwemmt waren, untersucht. Bei den Versuchen, zu welchen ich Bacterium aquatilis radiatus als Reagens verwendete, wird dies ausdrücklich bemerkt, die übrigen Versuche wurden mit Bact. fluorescens liquefaciens gemacht.

Blut. Wenn ich etwas Blutgerinnsel nahm und das Deckglas des Präparates mit Vaselin oder Apáthy'schem Lack zur Verhinderung des Luftzutrittes umrandete, so konnte ich beobachten, dass die Bewegung der Bacterien in einiger Entfernung von der Blutmasse gänzlich aufgehört hatte, wenn um dieselbe sich noch viele Bacterien lebhaft herumtummelten. Bei Untersuchung mit dem Mikrospectroskop fand ich regelmässig, dass die Reaction noch andauerte, wenn die beiden Streifen des Oxyhaemoglobins eben verschwunden waren, und der Absorptionsstreifen des reducirten Haemoglobins bereits erkannt

werden konnte. Machte ich denselben Versuch mit Blut eines im Kohlensäurestrom erstickten Frosches, so blieb die Reaction aus, ein Beweis, dass es sich wirklich um eine Wirkung von Sauerstoff handelt. Mit demselben Resultate wurde auch Blut vom Menschen, von der Katze und vom Hunde untersucht.

Quergestreifte Muskeln. Sie geben eine wenn auch nicht so intensive Reaction wie Blut, doch immerhin ein unzweifelhaft positives Resultat, wobei es wahrscheinlich ist, dass ihr bekannter Haemoglobingehalt eine Rolle spielt. Einen Unterschied in der Reaction von rothen und weissen Muskeln konnte ich nicht nachweisen. Skelettmuskeln vom Kaninchen und der Katze geben die gleiche Reaction wie die des Frosches.

Nerv, Rückenmark und Gehirn des Frosches gaben gute Reaction, ebenso die von Kaninchen, Maus und Huhn. Die Versuche habe ich mit Bact. aquatilis radiatus gemacht, das sich bei diesen Geweben als empfindlicher erwiesen hat. Dass es sich hier nicht um eine Reaction auf Sauerstoff handelt, konnte ich nachweisen. Wenn man einen Frosch im Vacuum ersticken lässt, so geben die genannten Gewebe immer noch unveränderte Reaction. Um zu erfahren, welcher chemische Bestandtheil dieser Gewebe das wirksame Agens sei, stellte ich folgende Versuche an. Gegen Protagon und Cholesterin, wie immer ich die Körper behandelte, verhielten sich die Bacterien gänzlich indifferent. Hingegen gab Lecithin eine gute Reaction. Es beobachtete schon Pfeffer[1] ziemlich reichliches Einschwärmen von Bodo saltans in eine Capillare mit Lecithinlösung.

Dabei war es gleichgiltig, ob ich »reines« käufliches Lecithin nahm oder solches, das ich aus Hühnereidotter mit Alkohol extrahirt hatte. Wenn ich Lecithin in einigen Tropfen Wasser quellen liess, den etwa enthaltenen Sauerstoff auspumpte und dann rasch etwas von dem gequollenen Lecithin unter ein Deckglas mit Bacterienwasser brachte, so bekam ich immer gute Reaction. Nach Erlöschen derselben konnte ich keine Änderung in der Doppelbrechung des Lecithins unter dem Polarisationsmikroskop bemerken.

[1] Pfeffer, Untersuchungen aus dem Botan. Institut zu Tübingen. Bd. II, S. 605.

Reizte ich einen Nervus ischiadicus vom Frosche durch mehrere Stunden tetanisch und machte dann von dem gereizten und dem ungereizten Nerven der anderen Seite je ein Präparat, so konnte ich keinen Unterschied in der Bacterienreaction erkennen.

Fettgewebe. Wenn ich etwas Fettgewebe vom Panniculus adiposus des Frosches nahm, so bekam ich mit Bacillus fluorescens liquefaciens regelmässig eine starke Reaction. Ebenso verhielt sich Fettgewebe von *Triton cristatus*, vom Huhn, von der Maus, dem Hunde und dem Menschen. Statt Fettgewebe konnte ich mit gleichem Erfolge einen Fetttropfen, den ich mir durch Auspressen von Fettgewebe verschafft hatte, oder Olivenöl verwenden. Weitere Versuche ergaben, dass Glycerin auf die Bacterien gar keine Wirkung ausübte, wie auch Pfeffer[1] bei Bacterium termo, Spirillum undula und Bodo saltans beobachtet hat. Hingegen gaben reine Palmitin- und Stearinsäure gute Reaction, so dass die Vermuthung nahe liegt, dass die im natürlichen Fett vorkommenden freien Fettsäuren eine Anziehung auf die Bacterien ausüben. Doch spielt bei der Reaction auf Fette auch der absorbirte Sauerstoff eine Rolle. Ich liess Frösche im Vacuum ersticken, nahm dann ein Stückchen Fettgewebe heraus, brachte es rasch in einen Tropfen bacterienhältigen Wassers, bedeckte mit dem Deckglas und verkittete die Ränder, um den Luftzutritt zu verhindern. Zum Controlpräparat wurde Fettgewebe eines kurz vorher an der Luft getödteten Frosches genommen, in einen Tropfen desselben Bacterienwassers gebracht und ebenfalls verschlossen. Dabei wählte ich das Fettgewebe für das Controlpräparat immer so, dass die beiden Präparate ungefähr von gleich fettreichen Panniculi adiposi stammten. Da zeigte sich nun regelmässig, dass die Reaction am Fettgewebe des erstickten Frosches bedeutend schwächer war, als an dem des normalen. Das gleiche Resultat erhielt ich, wenn ich Frösche im Wasserstoffstrom oder in Wasser erstickt hatte.

---

[1] Pfeffer, Über chemotactische Bewegungserscheinungen von Bacterien, Flagellaten und Volvocineen. Unters. aus d. Botan. Inst. zu Tübingen. Bd. II, S. 604.

Liess ich Fett des erstickten Frosches an der Luft auch nur kurze Zeit liegen, oder schüttelte etwas von dem Gewebe mit Wasser und Luft in einer Eprouvette, so war der Unterschied zwischen dem Fett des erstickten Frosches und dem Controlfett, mit dem genau dasselbe vorgenommen worden war, verschwunden. Um mich über die Menge des absorbirten Sauerstoffes zu unterrichten, habe ich reines Olivenöl, das einen Tag offen an der Luft gestanden war, unter Erwärmen auf ungefähr 80° C. und Schütteln ausgepumpt und die ausgepumpten Gase nach der Methode von Bunsen analysirt. Das Olivenöl von der Temperatur 11° C. war bei dem Luftdruck von 756 *mm* Hg in den Recipienten einer Geisslerischen Luftpumpe eingefüllt worden. Das auspumpbare Gasgemisch besteht aus Kohlensäure, Sauerstoff und Stickstoff. Und zwar enthalten 100 cm^3 Olivenöl 0·250 cm^3 Kohlensäure, 1·665 cm^3 Sauerstoff, 4·555 cm^3 Stickstoff, absorbirt, berechnet für die Temperatur von 0° C. und 760 *mm* Hg-Druck. Zweitens habe ich Fettgewebe von möglichst frischen menschlichen Leichen ausgepresst, das gewonnene Fett getrocknet und filtrirt. Dann liess ich es bei 37° C. an der Luft stehen und füllte es bei derselben Temperatur und 750 *mm* Luftdruck in den Recipienten der Luftpumpe. Unter Erwärmen auf 80° C. und häufigem Schütteln pumpte ich das Gas aus. Die Analyse wurde nach Bunsen ausgeführt. Darnach absorbiren 100 cm^3 menschliches Fett 0·730 cm^3 Kohlensäure, 2·018 cm^3 Sauerstoff, 4·481 cm^3 Stickstoff, berechnet bei 0° C. und 760 *mm* Hg-Druck.

Herr Hofrath E. Ludwig war so freundlich, mir zu erlauben, die beiden oben angeführten Analysen in seinem Laboratorium für medicinische Chemie auszuführen, wofür ich ihm meinen wärmsten Dank ausspreche.

Dieses Resultat scheint mir von Interesse, wenn man den Gasgehalt anderer Flüssigkeiten in Vergleich zieht:

100 cm^3 an der Luft gestandenen Wassers enthalten bei 20° C. 1·704 cm^3 Luft,[1] somit, da 35 Procent davon Sauerstoff sind, 0·596 cm^3 Sauerstoff und 1 108 cm^3 Stickstoff, sämmtlich reducirt auf 0° C. und 760 *mm* Hg-Druck. Das

[1] Landolt und Börnstein, Physikalisch-chem. Tabellen. 1883, S. 169.

menschliche Fett bei Körpertemperatur enthielt in 100 cm^3, in derselben Weise berechnet 2·018 cm^3 Sauerstoff und 4·481 cm^3 Stickstoff, somit näherungsweise viermal soviel von jedem der beiden Gase.

Soweit ich die Literatur kenne, ist über die Grösse der Absorption von Sauerstoff in Fett nichts bekannt. Bloss A. Vogel und C. Reischauer[1] haben gefunden, dass durch eine Ölschichte atmosphärischer Sauerstoff diffundirt und dass die Geschwindigkeit der Diffusion von der Natur des verwendeten Öles abhängt.

Es liegt der Gedanke nahe, dass dieser Gasvorrath im Fettgewebe des thierischen Körpers physiologisch nicht bedeutungslos sei.

Wenn oben unter den deutliche Reaction liefernden Organen Leber, Knorpel und Ovarium vom Frosche angeführt wurden, so ist nun vorauszusetzen, dass diess auf dem Fettgehalte derselben beruht, umsomehr als der Gegensatz zwischen dem Ovarium des Frosches und des Kaninchens so auffallend hervortritt. Die Bacterienreaction von Gehirn, Rückenmark und markhaltigen Nerven ist wohl mit derselben Wahrscheinlichkeit auf die Anwesenheit des freien Lecithins zurückzuführen, und wenn, wie wir sahen, auch die marklosen Nervenfasern des Tractus olfactorius des Hechtes und die Retina ein positives Resultat ergaben, so ist das eine neue Stütze für die Angabe von Gad und Heymans[2], dass auch marklose Fasern Lecithin enthalten, aber nicht frei, sondern in gebundener Form. Es würde also auch letzteres die Bacterienreaction geben.

Die Wirkung des Milzgewebes auf Bacterien ist wohl dem reichen Gehalte an rothen Blutkörperchen zuzuschreiben.

---

[1] A. Vogel und C. Reischauer, Über die Durchdringung einer Ölschicht durch atmosphärischen Sauerstoff. Cit. nach Fortschritte der Physik. Bd. XV, S. 117.

[2] Arch. f. Anatom. u. Phys. Phys. Abth. 1890. S. 530.